Marek Rusin
Stanisław Szala

Zakład Biologii Nowotworów
Centrum Onkologii
Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie
Gliwice

Klonowanie genów metodą hybrydyzacji różnicowej

1. Wprowadzenie

Geny swoiście transkrybowane w badanym typie komórek mogą być sklonowane za pomocą metod określanych jako „hybrydyzacja plus/minus" oraz „hybrydyzacja różnicowa". Klonowanie tej grupy genów opiera się na obserwacji, że różnego typu komórki, lub te same komórki w różnych stanach fizjologicznych, posiadają odmienny skład populacji mRNA występującego obok mRNA tkankowo nieswoistego, obecnego we wszystkich typach komórek. Od innych metod klonowania, metoda hybrydyzacji różnicowej i metoda plus/minus, różnią się między innymi tym, że do ich stosowania nie jest konieczne ani posiadanie oczyszczonego białka kodowanego przez gen, ani posiadanie sklonowanego homologicznego genu z innego gatunku.

Posługując się hybrydyzacją różnicową można sklonować geny wytwarzające w komórce nieliczne kopie mRNA. Metody plus/minus używa się do klonowania genów kodujących licznie występujące mRNA.

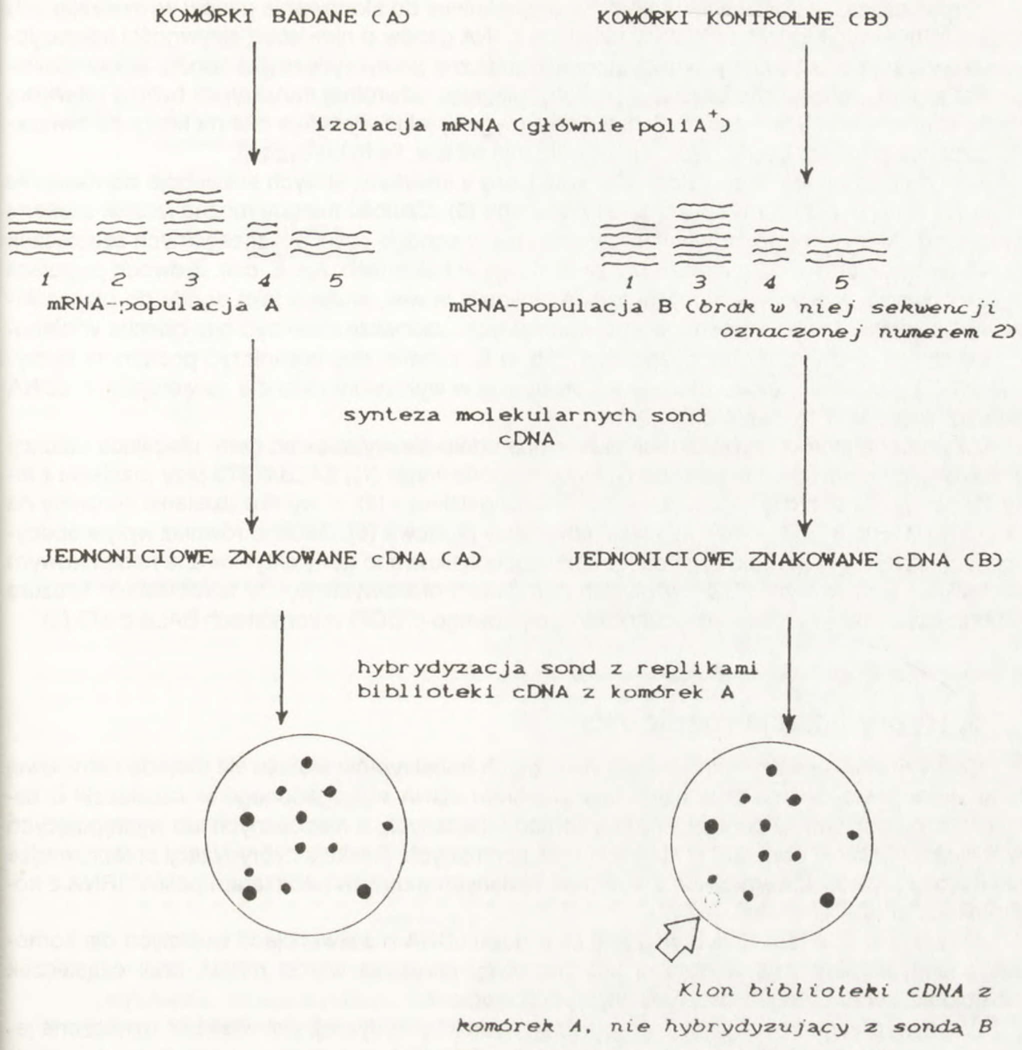
W metodzie hybrydyzacji plus/minus hybrydyzuje się dwie repliki biblioteki cDNA z badanych komórek: jedną ze znakowanym cDNA z tych samych komórek, drugą ze znakowanym cDNA z komórek kontrolnych. Klony zawierające cDNA swoiste dla komórek badanych hybrydyzują tylko z pierwszą sondą.

Hybrydyzacja różnicowa jest metodą bardziej skomplikowaną. W jej kluczowym etapie uzyskuje się cDNA wzbogacony w cząsteczki o sekwencjach swoistych dla komórek badanych. Preparat cDNA może służyć do konstrukcji tzw. biblioteki różnicowej oraz jako sonda różnicowa do przeszukiwania bibliotek. Przy stosowaniu hybrydyzacji różnicowej bardzo pomocna jest enzymatyczna amplifikacja DNA *in vitro* (ang. *polymerase chain reaction* – PCR).

2. Hybrydyzacja plus/minus

Z komórek badanych i kontrolnych izoluje się mRNA (głównie poliA^+), który służy do syntezy dwóch znakowanych molekularnych sond cDNA (rys. 1). Otrzymane sondy hybrydyzuje się z replikami biblioteki cDNA pochodzącej z komórek badanych. Po autoradiografii replik porównuje się intensywność zaczernienia (sygnału), jakie wywołały poszczególne klony na błonie fotograficznej. Za pozytywne (przeznaczone do dalszej analizy) uznaje się te spośród nich, które wykazują hybrydyzację z sondą z komórek badanych i nie wykazują hybrydyzacji z sondą kontrolną (1,2).

Po identyfikacji klonów pozytywnych sprawdza się czy ich inserty (wstawki – sklonowane sekwencje cDNA) pochodzą z tych samych, czy różnych mRNA. W tym celu inserty znakuje się i hybrydyzuje ze związanymi z filtrem insertami innych pozytywnych klonów. cDNA hybrydyzujące z tą samą sondą uznaje się za pochodzące z tych samych mRNA (3). Istnienie wielu homologicznych klonów pozytywnych wynika z obecności licznych kopii poszczególnych transkryptów w populacji mRNA, która posłużyła do konstrukcji przeszukiwanej biblioteki cDNA.



Rys. 1. Schemat hybrydyzacji plus/minus. Za pomocą tej metody można zidentyfikować klony zawierające sekwencje cDNA genów wytwarzających mRNA tylko w jednych z porównywanych komórek. W przedstawionym przykładzie zaznaczono klon pozytywny. Zawiera on cDNA genu wytwarzającego w komórkach A mRNA oznaczony nr 2.

W celu sprawdzenia czy inserty (cDNA) różnych pozytywnych klonów pochodzą rzeczywiście z cząsteczek mRNA obecnych wyłącznie (lub w większej ilości) w komórkach badanych, inserty znakuje się i używa się ich jako sond molekularnych do analizy mRNA z porównywanych komórek (tzw. ang. *Northern blotting*). Cząsteczki cDNA, które jako sondy wykryły mRNA częściej występujące w komórkach eksperymentalnych, sekwencjonuje się w celu określenia tożsamości genów z których pochodzą (4).

Ograniczenie zastosowania hybrydyzacji plus/minus do klonowania genów wytwarzających częste mRNA wynika stąd, że klony z insertami cDNA genów o niewielkiej aktywności transkrypcyjnej wykazują bardzo słaby sygnał autoradiograficzny po hybrydyzacji z sondą. Spowodowane jest to tym, że nieliczne cząsteczki mRNA, ulegając odwrotnej transkrypcji tworzą niewielką liczbę cząsteczek (cDNA) sondy. Zaczernienie (sygnał) jakie wywołują one na kliszy po związaniu z homologicznym klonem nie daje się odróżnić od tzw. tła hybrydyzacji.

Metodą plus/minus można zidentyfikować klony z insertami, których sekwencje stanowią nie mniej niż 0,1% populacji mRNA komórek badanych (5). Czułość metody można jednak czasami zwiększyć. Jednym ze sposobów jest zwiększenie w sondzie ilości poszczególnych cząsteczek cDNA poprzez ich ligację z wektorem i amplifikację w bakteriach, np. *E. coli*. Z dwóch populacji cDNA powstają wtedy dwie zamplifikowane biblioteki *in vivo*, służące jako sondy do przeszukiwania biblioteki cDNA z komórek eksperymentalnych. Jednakże musi być ona obecna w niehomologicznym plazmidzie oraz gospodarzu, np. w *B. subtilis*, aby ograniczyć poziom tła hybrydyzacji (6). Opisana metoda okazała się efektywna w wykrywaniu klonów zawierających cDNA bardzo nielicznych transkryptów (0,01%).

Za pomocą metody hybrydyzacji plus/minus udało się wyizolować geny ulegające indukcji w komórkach: nerki chomika w fazie G_1 cyklu komórkowego (7); BALB/c 3T3 przy przejściu z fazy G_0 do G_1 (2); drożdży rosnących w obecności galaktozy (8); w wyniku działania surowicy na komórki BALB/c 3T3 (1) oraz i na mysie fibroblasty płodowe (6). Badano również wpływ specyficznych czynników wzrostowych na komórki. Zidentyfikowano geny aktywowane nabłonkowym czynnikiem wzrostowym (EGF) w mysich komórkach płodowych (9) i w fibroblastach szczura (4) oraz czynnikiem wzrostowym pochodzenia płytkowego (PDGF) w komórkach BALB/c 3T3 (3).

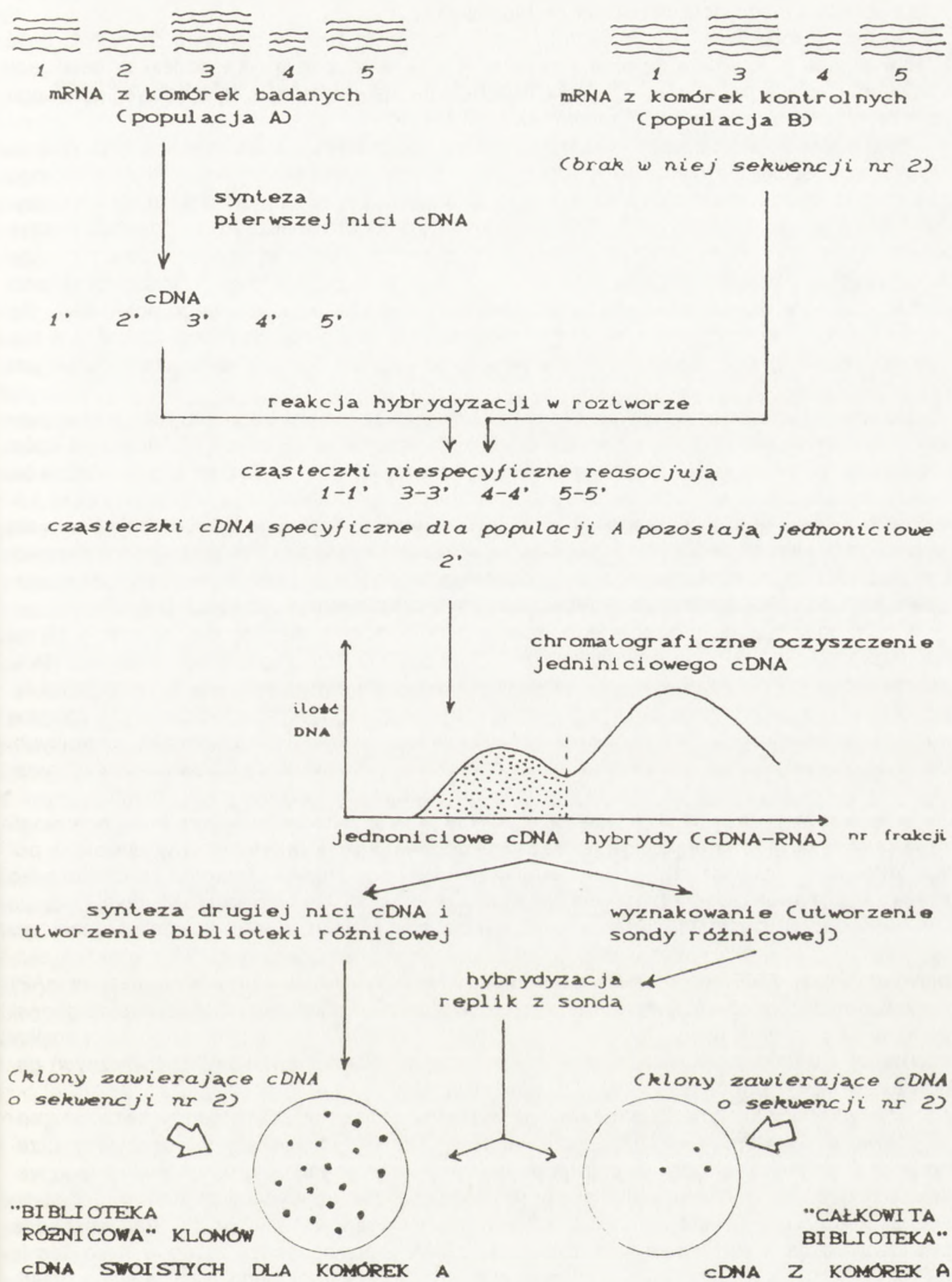
3. Hybrydyzacja różnicowa

Do wykrywania nielicznych i bardzo nielicznych transkryptów stosuje się metodę różnicowej hybrydyzacji. Ma ona na celu uzyskanie preparatu cDNA wzbogaconego w cząsteczki o sekwencjach obecnych w populacji mRNA komórek badanych, a nieobecnych lub występujących w mniejszej ilości w populacji mRNA komórek kontrolnych. Reakcję hybrydyzacji przeprowadza się między jednoniciowym cDNA z komórek badanych a dużym nadmiarem poli(A^+)RNA z komórek kontrolnych (rys. 2).

Po zakończeniu reakcji hybrydyzacji, cząsteczki cDNA o sekwencjach swoistych dla komórek badanych pozostają w postaci jednoniciowej, ponieważ wśród mRNA brak cząsteczek homologicznych, z którymi mogłyby zhybrydyzować.

Ważnym parametrem opisującym przebieg reakcji hybrydyzacji jest wielkość oznaczona jako R_0t. Jest ona funkcją zastosowanego stężenia RNA (R_0) oraz czasu trwania hybrydyzacji (t) i wyraża się ją w jednostkach $mol \cdot s \cdot l^{-1}$. Wartość, jaką R_0t musi osiągnąć, aby reakcja hybrydyzacji zaszła do końca zależy od złożoności poli(A^+)RNA z komórek kontrolnych. Z reguły wystarcza osiągnięcie wartości kilku tysięcy (10). Dojście hybrydyzacji do końca można przyspieszyć stosując duże stężenie RNA oraz zwiększając stężenie soli w mieszaninie hybrydyzacyjnej. Wydłużanie czasu hybrydyzacji w celu doprowadzenia jej do końca przy niskim stężeniu soli i RNA może zakończyć się niepowodzeniem ze względu na termiczny rozkład RNA (5). Ponadto cząsteczki cDNA o rozmiarach 120–250 nukleotydów hybrydyzują wolniej niż

Rys. 2. Schemat hybrydyzacji różnicowej. W wyniku odwrotnej transkrypcji powstają cząsteczki o sekwencjach komplementarnych do mRNA (stąd oznaczono je znaczkiem „prim"). Porównując ilość klonów, które w przeszukiwanych bibliotekach hybrydyzują z sondą różnicową (występują w niej sekwencje nr 2) można zauważyć w bibliotece różnicowej zagęszczenie klonów z cDNA swoistymi dla komórek A.


1 2 3 4 5
mRNA z komórek badanych
(populacja A)
1 3 4 5
mRNA z komórek kontrolnych
(populacja B)
(brak w niej sekwencji nr 2)
synteza
pierwszej nici cDNA
cDNA
1' 2' 3' 4' 5'
reakcja hybrydyzacji w roztworze
cząsteczki niespecyficzne reasocjują
1-1' 3-3' 4-4' 5-5'
cząsteczki cDNA specyficzne dla populacji A pozostają jednoniciowe
2'
chromatograficzne oczyszczenie
jednniciowego cDNA
ilość
DNA
jednoniciowe cDNA
hybrydy (cDNA-RNA)
nr frakcji
synteza drugiej nici cDNA i
utworzenie biblioteki różnicowej
wyznakowanie (utworzenie
sondy różnicowej)
hybrydyzacja
replik z sondą
(klony zawierające cDNA
o sekwencji nr 2)
(klony zawierające cDNA
o sekwencji nr 2)
"BIBLIOTEKA
RÓŻNICOWA" KLONÓW
cDNA SWOISTYCH DLA KOMÓREK A
"CAŁKOWITA
BIBLIOTEKA"
cDNA Z KOMÓREK A

cząsteczki o długości 400–1200 nukleotydów. Cząsteczki dłuższe niż 400 nukleotydów hybrydyzują z podobną prędkością niezależnie od długości (11).

Do reakcji różnicowej hybrydyzacji używa się nadmiaru RNA w stosunku do cDNA. Ilość RNA w postaci jednoniciowej pozostaje w przybliżeniu stała, pomimo zachodzącej reasocjacji komplementarnych cząsteczek cDNA i mRNA. Reakcja jest zatem pierwszorzędowa i przebiega szybciej niż drugorzędowa z tymi samymi składnikami (5).

Zwykle stosuje się co najmniej dziesięciokrotny nadmiar RNA. Użyty nadmiar RNA oblicza się nie w stosunku do rzeczywistej ilości cDNA, lecz w stosunku do ilości RNA, z którego zostało ono zsyntetyzowane. Wynika to z tego, że kopie cDNA są z reguły krótsze niż ich matryce. Jeśli na przykład z 5 μg poliA^{+}RNA uzyskano 1 μg cDNA oznacza to, że powstały krótsze kopie wszystkich cząsteczek RNA, a nie kopie o pełnej długości z wydajnością 20% (10). Aby zatem uzyskać dziesięciokrotny nadmiar RNA w stosunku do przykładowo przedstawionej ilości cDNA (1μg), do hybrydyzacji trzeba – po pierwsze – użyć 50 μg kontrolnego poliA^{+}RNA. Po drugie, w wyniku hybrydyzacji z n–krotnym nadmiarem RNA, po dojściu reakcji do końca w formie jednoniciowej, pozostaną również te sekwencje wspólne, których w populacji cDNA jest ponad n razy więcej.

Do reakcji różnicowej hybrydyzacji można używać także małego nadmiaru RNA pod warunkiem, że hybrydyzacja dojdzie do końca dzięki jego wysokiemu stężeniu (12). Stosunek ilości cząsteczek mRNA do cDNA może wynosić 10:1, a nawet 1:1 (12,13). Taki stosunek składników reakcji ma umożliwić wykrycie genów, które wytwarzają tylko kilkakrotnie więcej mRNA w komórkach eksperymentalnych aniżeli w kontrolnych. Stosując tego typu hybrydyzację udało się wykryć geny, których transkrypcja zwiększa się w niewielkim stopniu, np. pod wpływem uszkodzenia DNA (13) lub szoku termicznego (12). Metoda hybrydyzacji różnicowej przy niskim stosunku RNA do cDNA została szczegółowo opisana w pracy Fargnoliego i wsp. (14).

Po zakończeniu hybrydyzacji, jednoniciowy cDNA oddziela się metodą chromatografii na hydroksyapatycie (HAP) od cząsteczek dwuniciowych i nie przereagowanego nadmiaru RNA. Jednoniciowy cDNA ulega wymyciu z kolumny fosforanem sodu o stężeniu 0,12 M (pH 6,8), pozostałe cząsteczki ulegają elucji przy zastosowaniu wyższego stężenia fosforanu (5). Zebraną frakcję jednoniciowego cDNA ponownie hybrydyzuje się z poli(A^{+})RNA z komórek kontrolnych, po czym produkty reakcji rozdziela się tak jak poprzednio (15). Kilkukrotne powtarzanie hybrydyzacji ma na celu usunięcie jak największej ilości cząsteczek o sekwencjach wspólnych.

Wygodne jest pozbycie się sekwencji cDNA nie tworzących trwałych hybrydów z homologicznym RNA. Aby to osiągnąć jednoniciową, końcową frakcję cDNA hybrydyzuje się z poli(A^{+})RNA na matrycy którego zostało zsyntetyzowane i po rozdziale chromatograficznym tylko cDNA z frakcji dwuniciowej przeznacza się do tworzenia sondy lub biblioteki różnicowej (14).

Reakcję różnicowej hybrydyzacji można wykorzystać również do wyizolowania komórkowo „swoistych" genów aktywnych w dwóch typach komórek. Jednoniciowy cDNA z komórek eksperymentalnych, z którego usunięto (za pomocą reakcji hybrydyzacji i chromatografii na HAP) cząsteczki cDNA genów aktywnych we wszystkich typach komórek (ang. *housekeeping genes*) poddaje się ponownej hybrydyzacji z mRNA (poliA^{+}) z komórek kontrolnych. Do dalszej analizy zachowuje się frakcję dwuniciową, w której znajdują się cDNA komórkowo specyficznych genów aktywnych w komórkach badanych i kontrolnych (16).

Gdyby końcowa frakcja cDNA zawierała wyłącznie cząsteczki cDNA genów swoiście transkrybowanych w komórkach badanych, wtedy w celu ich identyfikacji wystarczyłoby przeprowadzić jednoniciowy cDNA w cząsteczki dwuniciowe, wprowadzić je do odpowiedniego wektora i poddać sekwencjonowaniu inserty (cDNA) przypadkowo wybranych klonów. Jednakże we frakcji końcowej zawsze są obecne sekwencje cDNA genów nieswoistych. Stąd niezbędna jest identyfikacja w jej obrębie tych cząsteczek cDNA, które pochodzą z genów specyficznie transkrybowanych w komórkach eksperymentalnych. Sposoby tej identyfikacji zostaną przedstawione poniżej.

Po zsyntetyzowaniu drugiej nici, cDNA z frakcji końcowej może być użyty do skonstruowania tzw. biblioteki różnicowej, wzbogaconej w klony z sekwencjami genów swoistych. Nie trzeba więc przeszukiwać bardzo dużej liczby klonów, aby wykryć te spośród nich, które posiadają swoisty cDNA. Bibliotekę różnicową można przeszukiwać metodą plus/minus używając sond w postaci całkowitego cDNA z komórek eksperymentalnych oraz kontrolnych. Szanse wykrycia klonów cDNA genów swoistych o niskiej aktywności transkrypcyjnej zwiększają się jednak dopiero wówczas, gdy do hybrydyzacji plus/minus zostanie użyta jako jedna z sond tzw. sonda różnicowa - znakowana, końcowa frakcja cDNA, w której sekwencje swoiste są zagęszczone. W takim przypadku druga sonda może pochodzić albo z całkowitego cDNA komórek badanych (14), albo z cDNA komórek kontrolnych (17). Klony zawierające cDNA genów swoistych dają silniejszy sygnał z sondą różnicową.

Wykonanie kilku replik biblioteki i przeszukiwanie jej wieloma sondami różnicowymi daje możliwość wyizolowania bardzo specyficznych sekwencji. Yancopoulos i wsp. (18) wykonali pięć replik biblioteki różnicowej wzbogaconej w sekwencje swoiste dla prelimfocytów B i każdą z nich hybrydyzowali z jedną sondą różnicową. Użyte sondy powstały w reakcji: 1) cDNA prelimfocytów B z mRNA fibroblastów, 2) cDNA fibroblastów z mRNA prelimfocytów B, 3) cDNA komórek szpiczaka z mRNA prelimfocytów B, 4) cDNA prelimfocytów B z mRNA komórek szpiczaka. Sondę piątą dodatkowo wzbogacono w bardzo nieliczne sekwencje swoiste dla prelimfocytów B. Autorom (18) udało się wyizolować cDNA genów aktywnych swoiście w prelimfocytach B.

Jeżeli frakcja końcowa jest silnie wzbogacona w swoiste sekwencje, może zostać użyta do konstrukcji biblioteki różnicowej oraz jako sonda molekularna do jej przeszukiwania. W eksperymencie opisanym przez Hedricka i wsp. (19), w którym użyto cDNA z limfocytów T i poliA$^+$RNA z limfocytów B, otrzymano wzbogaconą frakcję cDNA, która zawierała kilkadziesiąt różnych sekwencji. Po przeszukaniu około 5000 klonów biblioteki różnicowej za pomocą wzbogaconej frakcji cDNA jako sondy, udało się zidentyfikować gen kodujący jeden z łańcuchów receptora antygenowego limfocytów T.

Wzbogacona sonda molekularna może również służyć do przeszukiwania niewzbogaconej biblioteki cDNA. Na przykład Matsushime i wsp. (20) przeszuliwali bibliotekę cDNA z pobudzonych do podziałów czynnikiem wzrostowym (CSF-1) mysich makrofagów, za pomocą wzbogaconej sondy molekularnej powstałej w wyniku reakcji cDNA komórek pobudzonych CSF-1 z mRNA komórek zatrzymanych w fazie G_1. Udało się w ten sposób wyizolować cDNA genów nowej rodziny cyklin.

Travis i wsp. (21) zastosowali inny sposób przygotowania sondy wzbogaconej. Hybrydyzowali oni znakowany, jednoniciowy cDNA z badanych komórek z osiemdziesięciokrotnym nadmiarem nieznakowanego, dwuniciowego cDNA z komórek kontrolnych. Ze względu na dużą ilość DNA w roztworze hybrydyzację przeprowadzono w obecności emulsji fenolowej (22). Następnie, oddzielono cząsteczki dwuniciowe od jednoniciowych na hydroksyapatycie. We frakcji jednoniciowej, która posłużyła jako sonda, radioaktywne były te cząsteczki cDNA, które były swoiste dla badanych komórek. Otrzymaną sondą, po przeszukaniu niewzbogaconej biblioteki cDNA, udało się wykryć bardzo rzadkie sekwencje (0,001%) swoiste dla kory mózgowej małpy.

4. Zastosowanie bibliotek cDNA do hybrydyzacji różnicowej

Opisywana reakcja między cDNA z komórek eksperymentalnych i poliA$^+$RNA z komórek kontrolnych była najwcześniejszym wariantem hybrydyzacji różnicowej (23,24). Do wydzielenia sekwencji wspólnych wykorzystuje się fakt tworzenia przez nie hybrydów, które łatwo można oddzielić od jednoniciowego, swoistego cDNA dzięki chromatografii na hydroksyapatycie. Istnieje też inna metoda oddzielania sekwencji wspólnych, często wykorzystywana wówczas, gdy do hybrydyzacji używa się dwóch bibliotek cDNA (jednej z komórek badanych, drugiej z kontrol-

nych). Polega ona na hybrydyzacji cDNA z badanych komórek z nadmiarem biotynylowanego, kontrolnego cDNA. Nieswoiste cząsteczki badanego cDNA zreasocjują z homologicznymi cząsteczkami biotynylowanymi (będą zatem pośrednio połączone z biotyną). Sekwencje swoiste dla komórek eksperymentalnych pozostaną niepołączone z biotyną (nawet pośrednio). Po zakończeniu reakcji hybrydyzacji, cząsteczki swoiste oddziela się od cząsteczek nieswoistych i nadmiaru biotynylowanego cDNA za pomocą awidyny lub streptawidyny – białek mających powinowactwo do biotyny. Do mieszaniny hybrydyzacyjnej dodaje się jednego z tych białek, a następnie oddziela się cząsteczki cDNA związane z białkiem, od cząsteczek niezwiązanych. Można to wykonać metodą chromatografii (nośnikiem jest agaroza związana z miedzią i kwasem iminodwuoctowym) (25); poprzez ekstrakcję cząsteczek związanych ze streptawidyną za pomocą mieszaniny fenolu i chloroformu nasyconej buforem TE (26); przez precypitację z żywicą mającą powinowactwo do awidyny (27).

cDNA można przechowywać zarówno w formie bibliotek *in vivo*, jak i *in vitro*. W bibliotece *in vivo* znajduje się w wektorze plazmidowym lub fagowym i może być amplifikowany w odpowiednich komórkach (27). Konstrukcja biblioteki *in vitro* polega na połączeniu za pomocą ligazy DNA z faga T4, „tępych" końców dwuniciowego cDNA z „tępym" końcem tzw. oligowektora. Oligowektor to dwuniciowy oligonukleotyd, „tępy" na jednym końcu oraz posiadający nieufosforylowany, jednoniciowy odcinek na drugim końcu. Oligowektor posiada również, zaprojektowane podczas jego syntezy, sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne. Tak powstaje odnawialne źródło cDNA mogące służyć do hybrydyzacji różnicowej. Połączone z oligowektorami cDNA można bowiem powielić za pomocą enzymatycznej metody amplifikacji DNA *in vitro* (PCR) (28) stosując oligonukleotyd komplementarny do oligowektora. Otrzymany w wyniku hybrydyzacji wzbogacony cDNA może być użyty po amplifikacji i wyznakowaniu, jako sonda różnicowa lub może być wbudowany w wektor plazmidowy lub fagowy dzięki obecności w oligowektorze miejsc restrykcyjnych (17,29).

Używanie bibliotek w metodzie hybrydyzacji różnicowej ma tę zaletę, że cDNA może być amplifikowany. Dlatego można na przykład rozpocząć eksperyment posiadając nawet niewielką ilość poliA^+RNA (27,21). Użycie bibliotek ma również pewne ograniczenia, a mianowicie niektóre sekwencje mogą być w nich reprezentowane częściej lub rzadziej niż w wyjściowym cDNA. Niektóre sekwencje występujące w komórkach w niewielkiej ilości mogą być nieobecne w bibliotece *in vivo*. W bibliotece *in vitro* mogą być nadmiernie reprezentowane krótsze sekwencje, ponieważ łatwiej ulegają one amplifikacji metodą PCR niż sekwencje długie. Trzeba również pamiętać, że polimerazy DNA stosowane w PCR stosunkowo często wprowadzają w produkt błędne nukleotydy (np. polimeraza z *Thermus aquaticus* wprowadza błędnie około 10^{-4}– 10^{-5} nukleotydów na jeden cykl amplifikacji) (28). Ten problem można jednak rozwiązać poprzez wykorzystanie rekombinantów wyizolowanych z biblioteki amplifikowanej *in vitro* do zidentyfikowania bezbłędnych pierwowzorów z biblioteki cDNA uzyskanej, np. metodą Gubler i Hoffman (30).

5. Normalizacja bibliotek

Istotnym problemem mogącym wystąpić przy stosowaniu metody hybrydyzacji różnicowej jest osłabianie efektywności oddzielenia cząsteczek wspólnych na skutek obecności w populacji cDNA dużej masy identycznych sekwencji. Aby temu zapobiec, w zabiegu zwanym normalizacją, wyrównuje się ilość kopii wszystkich sekwencji cDNA obecnych w roztorze. Normalizacja opiera się na założeniu, że jeśli reasocjacja zdenaturowanego cDNA jest zgodna z kinetyką reakcji drugorzędowej, to rzadziej występujące sekwencje łączą się ze sobą wolniej niż częściej występujące, a wraz z upływem czasu frakcja jednoniciowa staje się coraz bardziej wyrównana pod względem ilości kopii poszczególnych cDNA. Po zakończeniu reakcji i usunięciu cząsteczek dwuniciowych, jednoniciowy, znormalizowany cDNA można przeprowadzić, za pomocą odpowiedniej polimerazy, w cząsteczki dwuniciowe (31,32).

6. Uwagi końcowe

Metoda hybrydyzacji różnicowej jest tak modyfikowana, aby można było przy jej zastosowaniu izolować komórkowo swoiste geny, a właściwie ich cDNA, o niskiej aktywności transkrypcyjnej. Niektórym badaczom udało się sklonować cDNA, których mRNA stanowią zaledwie 0,001% populacji wszytkich cząsteczek mRNA obecnych w badanych komórkach (18, 21). W związku z tym, że większość genów aktywnych w komórce wytwarza rzadkie transkrypty (33), wysiłki jakie wkłada się w ulepszanie i wykorzystywanie omawianej metody są uzasadnione. Przy poszukiwaniu bardzo rzadkich, komórkowo specyficznych cDNA, należy pamiętać o występowaniu tzw. „wyciekania genów" – zjawiska polegającego na bardzo słabej transkrypcji komórkowo swoistych genów w komórkach, w których nie pełnią one żadnej funkcji (34).

Warunkiem stosowania hybrydyzacji różnicowej jest istnienie zróżnicowanego poziomu mRNA poszukiwanych genów w dwu rodzajach komórek. Podstawową decyzją podejmowaną przy planowaniu badań jest zatem wybór komórek. Hybrydyzację różnicową stosowano do izolowania genów aktywnych transkrypcyjnie w fazie G_1 cyklu komórkowego (35), a także genów biorących udział w procesie różnicowania się komórek. Udało się na przykład sklonować geny produkujące zwiększoną ilość mRNA podczas zarodnikowania hodowli *Aspergillus* (15), sekwencje ulegające ekspresji w mysich prelimfocytach B (36) oraz w różnych stadiach rozwoju limfocytów B (18). Za pomocą metody hybrydyzacji różnicowej udało się wyizolować gen regulator myoD1; jego ekspresja powoduje przekształcenie fibroblastów w mioblasty (37). Wykryto również rzadkie mRNA swoiste dla kory mózgowej, których ekspresja jest zmniejszona u osób z chorobą Alzheimera (21). Hybrydyzacja różnicowa nadaje się także do izolacji nieznanych genów oraz identyfikacji genów już poznanych, aktywowanych w komórkach szkodliwymi czynnikami otoczenia zewnętrznego, powodującymi na przykład uszkodzenie DNA (13,14). Izolowano również geny aktywowane szokiem termicznym (12). Można również badać zmiany aktywności genów komórkowych spowodowane infekcją wiroidową (17, 27). Wiele badań z zastosowaniem omawianej metody koncentruje się również na biologii komórek nowotworowych. Izoluje się sekwencje aktywowane w komórkach stransformowanych nowotworowo (38), geny mogące być supresorami procesów nowotworowych (39), sekwencje aktywne tylko w pewnych rodzajach nowotworów (29), a także geny związane ze zdolnością komórek nowotworowych do przerzutowania (40).

Warto jeszcze wspomnieć o przedsięwzięciu, w którym posłużono się metodą hybrydyzacji różnicowej, a polegającym na automatycznym sekwencjonowaniu przypadkowo wybranych klonów z 4 bibliotek cDNA. Miało to na celu utworzenie ulegających ekspresji sekwencyjnych etykietek (ang. *expressed sequence tags*), którymi przeszukuje się banki danych aby przekonać się, czy zsekwencjonowane cDNA pochodzą ze znanych już genów, czy z genów dotąd nie zidentyfikowanych. Jedną z bibliotek wzbogacono w klony specyficzne dla mózgu, poprzez reakcję hybrydyzacji różnicowej biblioteki cDNA z komórek hipokampa z biblioteką cDNA linii fibroblastów płucnych (41). Zabieg ten miał na celu otrzymanie biblioteki, w której byłaby zmniejszona liczba klonów z sekwencjami cDNA znanych już genów; (30–60% wszystkich mRNA kodowanych przez ludzki genom ulega ekspresji w mózgu, a do tej pory znane są sekwencje zaledwie kilku procent ludzkich genów). Hybrydyzacja różnicowa może więc ułatwić zsekwencjonowanie ludzkiego genomu.

Literatura

1. Linzer D. I. H., Nathans D., (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4271–4275.
2. Lau L. F., Nathans D., (1985), The EMBO J., 4, 3145–3151.
3. Cochran B. H., Reffel A. C., Stiles C. D., (1983), Cell, 33, 939–947.
4. Matrisian L. M., Rautmann G., Magun B. E., Breatnach R., (1985), Nucleic Acid Research, 13, 711–726.
5. Sargent T. G., (1987), Methods in Enzymology, 152, 423–432.
6. Parfett C. L. J., Hofbauer R., Brudzynski K., Edwards D. R., Denhardt D. T., (1989), Gene, 82, 291–303.
7. Hirshhorn R. R., Aller P., Yuan Z., Gibson C. W., Baserga R., (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6004–6008.
8. John T. P. S., Davis R. W., (1979), Cell, 16, 443–452.
9. Foster D. N., Schmidt L. J., Hodgson C. P., Moses H. L., Getz M. J., (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 7317-7321.
10. Bothwell A., Yancopoulos G. D., Alt F. W., (1990), Methods for Cloning and Analysis of Eucaryotic Genes, 117-137, Jones and Burtlett Publishers, Boston.
11. Van Ness J., Hahn W. E., (1982), Nucleic Acid Research, 10, 8061–8077.
12. Fornace A. J. Jr., Mitchell J. B., (1986), Nucleic Acid Research, 14, 5793–5811.
13. Fornace A. J. Jr., Alamo I. Jr., Hollander M. C., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8800–8804.
14. Fargnoli J., Holbrook N. J., Fornace A. J. Jr., (1990), Analytical Biochemistry, 187, 364–373.
15. Zimmermann C. R., Orr W. C., Leclerc R. F., Barnard E. C., Timberlake W. E., (1980), Cell, 21, 709–715.
16. Mather E. L., Alt F. W., Bothwell A. L. M., Baltimore D., Koshland M. E., (1981), Cell, 23, 369–378.
17. Duguid J. R., Dinauer M. C., (1990), Nucleic Acid Research, 18, 2789–2792.
18. Yancopoulos G. D., Oltz E. M., Rathbun G., Barman J. E., Smith R. K., Lansford R. D., Rothman P., Okada A., Lee G., Morrow M., Kaplan K., Prockop S., Alt F. W., (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 5759–5763.
19. Hedrick S. M., Cochen D. I., Nielsen E. I., Davis M. M., (1984), Nature, 308, 149–153.
20. Matsushime H., Roussel M. F., Ashmun R. A., Sherr C. J., (1991), Cell, 65, 701–713.
21. Travis G. H., Sutcliffe J. G., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 1696–1700.
22. Kohne D. E., Levison S. A., Byers M. J., (1977), Biochemistry, 16, 5329–5341.
23. Stehelin B., Guntaka R., Varmus H., Bishop J. M., (1976), J. Mol. Biol., 101, 349–365.
24. Alt F. W., Kellems R. E., Bertino J. R., Schimke R. T., (1978), J. Biol. Chem., 253, 1357–1370.
25. Welcher A. A., Torres A. R., Ward D. C., (1986), Nucleic Acid Research, 14, 10027–10044.
26. Sive H. L., John T. S., (1988), Nucleic Acid Research, 16, 10937.
27. Duguid G. R., Rohwer R. G., Seed B., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5738–5742.
28. Erlich H. A., Gelfand D., Sninsky J. J., (1991), Science, 252, 1643–1651.
29. Timblin C., Battey J., Kuehl W. M., (1990), Nucleic Acid Research, 18, 1587–1593.
30. Gubler U., Hoffman B. J., (1983), Gene, 25, 263–269.
31. Ko M. S. H., (1990), Nucleic Acid Research, 18, 5705–5711.
32. Patanjali S. R., Parimoo S., Weissman S. W., (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1943–1947.
33. Hastie N. D., Bishop J. O., (1976), Cell, 9, 761–774.
34. Sarkar G., Sommer S. S., (1989), Science, 244, 331–334.
35. Nikaido T., Bradley D. W., Pardee A. B., (1991), Experimental Cell Research, 192, 102–109.
36. Sakaguchi N., Berger C. N., Melchers F., (1986), The EMBO J., 5, 2139–2147.
37. Davis R. L., Weintraub H., Lassar A. B., (1987), Cell, 51, 987–1000.
38. Scott M. R. D., Westphal K. -H., Rigby P. W. J., (1983), Cell, 34, 557–567.
39. Lee S. W., Tomasetto C., Sager R., (1991), Proc. Natl. Acad Sci. USA, 88, 2825–2829.
40. Phillips S. M., Bendall A. J., Ramshaw I. A., (1990), J. Natl. Cancer. Inst., 82, 199–203.
41. Adams M. D., Kelley J. M., Gocayne J. D., Dubnick M., Polymeropoulos M. H., Xiao H., Merril C. R., Wu A., Olde B., Moreno R. F., Kerlavage A. R., McCombie W. R., Venter J. C., (1991), Science, 252, 1651–1656.

Gene cloning using subtractive hybridization

Summary

Genes expressed in temporally, environmentally or tissue specific way can be cloned using subtractive hybridization. It involves hybridization of single stranded cDNA from one cell type with mollar excess of polyA^{+} RNA from another cell type. Unhybridized, cell specific cDNA is subsequently used or as subtractive probe or as material for construction of subtractive cDNA library. Modifications of this basic strategy are also discussed.

Adres dla korespondencji:
Marek Rusin, Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, 44–100 Gliwice.